

1899/02-73



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C07H 21/00, C12Q 1/68, C12N 15/11</b>		<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/65926</b> (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1999 (23.12.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01469 (22) Date de dépôt international: 17 juin 1999 (17.06.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/07870                      17 juin 1998 (17.06.98)                      FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): LAAYOUN, Ali [FR/FR]; Triangle Fleuri, 1. rue du Rhône, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon cedex 06 (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: METHOD FOR MARKING A RIBONUCLEIC ACID AND RESULTING MARKED RNA FRAGMENTS (54) Titre: PROCEDE DE MARQUAGE D'UN ACIDE RIBONUCLEIQUE ET FRAGMENTS D'ARN MARQUES AINSI OBTENUS (57) Abstract <p>The invention concerns a method for marking a synthetic or natural ribonucleic acid (RNA). It also concerns RNA fragments marked by said method and their use. Said method consists in: fragmenting the RNA; and marking at the terminal phosphate located at the 3' and/or 5' end of each said RNA fragment, said phosphate terminal having been released during fragmentation. The invention is particularly applicable in the field of medical diagnosis.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un procédé de marquage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel. Elle concerne également des fragments d'ARN marqués selon le procédé, ainsi que leur utilisation. Ce procédé consiste: à fragmenter l'ARN et à marquer au niveau du phosphate terminal situé à l'extrémité 3' et/ou 5' de chaque fragment dudit ARN, ledit phosphate terminal ayant été libéré lors de la fragmentation. L'invention trouve une application préférentielle dans le domaine du diagnostic médical.</p>			

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NI	Niège	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Procédé de marquage d'un acide ribonucléique et fragments d'ARN marqués  
ainsi obtenus**

La présente invention concerne un nouveau procédé de marquage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel.

5 Par ARN de synthèse, il faut comprendre ARN obtenu par une technique mise au point par l'homme; par exemple une technique d'amplification (PCR suivi d'une transcription) ou d'amplification transcriptionnelle (TMA). Par ARN naturel, il faut comprendre ARN obtenu par extraction d'une cellule, par exemple ARN messager, ribosomal, de transfert.

10 *L'état de la technique montre que de nombreuses méthodes existent pour marquer des nucléotides, des oligonucléotides ou des acides nucléiques ; les oligonucléotides et les acides nucléiques seront désignés par le terme polynucléotides. En ce qui concerne les oligonucléotides, le marquage peut s'effectuer soit lors de la synthèse, soit par incorporation d'au moins un nucléotide marqué.*

15 *Une première méthode consiste à fixer le marqueur sur la base, que celle-ci soit naturelle ou modifiée. Une deuxième méthode propose de fixer le marqueur sur le sucre, là encore qu'il soit naturel ou modifié. Une troisième méthode a pour objet la fixation du marqueur sur le phosphate.*

*La marquage sur la base a été notamment utilisé dans l'approche de marquage*  
20 *des acides nucléiques par incorporation de nucléotides directement marqués.*

*Le marquage sur le sucre est souvent utilisé dans le cas des sondes nucléiques préparées par synthèse chimique.*

*Le marquage sur le phosphate a été aussi utilisé pour introduire des bras fonctionnalisés et des marqueurs lors de la synthèse chimique des polynucléotides.*

25 *En fait l'homme du métier, qui doit effectuer un marquage d'un nucléotide, ou d'un analogue de nucléotide ou d'un acide nucléique, est enclin à effectuer cette fixation sur la base ou sur le sucre qui lui offrent plus de commodité et d'alternative. C'est d'ailleurs ce qui ressort de l'étude de nombreux documents, tels que EP-A-0.329.198, EP-A-0.302.175, EP-A-0.097.373, EP-A-0.063.879, US-A-5,449,767, US-*  
30 *A-5,328,824, WO-A-93/16094, DE-A-3.910.151, EP-A-0.567.841 pour la base ou EP-A-0.286.898 pour le sucre.*

Néanmoins, ces techniques ont certains inconvénients, dont les deux principaux sont la gêne stérique et l'influence engendrées par la présence d'un marqueur.

Dans le cas d'un marquage effectué sur la base, la gêne stérique est due à l'empiétement du marqueur sur l'espace où est présente une base voisine, que cette base  
5 voisine soit portée par un nucléotide adjacent du même brin ou par le brin complémentaire. Il est assez évident également que la présence du marqueur sur la base peut gêner l'efficacité et la spécificité, lors de l'incorporation enzymatique, et peut influencer la qualité des liaisons hydrogènes entre les deux brins complémentaires, ce qui peut nuire à l'hybridation.

10 Dans le cas d'un marquage sur le sucre, la gêne stérique est due à l'empiétement du marqueur sur l'espace où est présent un sucre adjacent porté par le même brin. Cette présence du marqueur peut éloigner deux bases adjacentes portées par le même brin et empêcher, par la suite, la bonne hybridation avec le brin complémentaire, du fait que les liaisons hydrogènes ne sont pas optimales entre les brins.

15 *La fixation du marqueur sur le phosphate est une technique plus complexe que la technique consistant à fonctionnaliser la base ou le sucre.*

*Pourtant dans certains documents, ont été proposées des techniques de marquage du phosphate. C'est par exemple le cas avec le document EP-A-0.280.058, qui décrit le marquage d'un nucléotide par fixation du marqueur sur le phosphate, ce  
20 dernier étant fixé sur le sucre en position 2' et/ou 5' quand le nucléotide est un désoxyribonucléotide, et en position 2', 3' et/ou 5' quand le nucléotide est un ribonucléotide. Il décrit également un polynucléotide ou oligonucléotide qui comprend au moins un nucléotide marqué comme décrit ci-dessus ; ce nucléotide est incorporé dans le polynucléotide ou l'oligonucléotide lors de la synthèse.*

25 Toutefois, le marquage, proposé par le document EP-A-0.280.058, ne permet pas d'obtenir un marquage uniforme des acides nucléiques. En effet, l'incorporation des nucléotides marqués dans les polynucléotides ne peut pas être contrôlée, il dépend entièrement de la composition en polynucléotides qui sera synthétisée. Ainsi certains polynucléotides peuvent contenir de nombreux nucléotides marqués alors que d'autres  
30 peuvent ne pas en contenir du tout. L'intensité du signal émis par ces acides nucléiques

ne sera donc pas uniforme, ce qui risque de rendre l'interprétation des résultats difficile lors de leur détection.

Dans ce cas, le marquage est un marquage biologique par incorporation, où l'on ne contrôle pas la position des nucléotides marqués.

5        *Le document US-A-5,317,098 concerne des acides nucléiques qui sont marqués à leur extrémité 5'. Cette fixation utilise l'imidazole et un bras de liaison. Il n'y a pas de fragmentation associée. De plus, le phosphate est rapporté, il y a donc utilisation de kinase.*

Néanmoins et logiquement, il y aura présence d'un phosphate à chaque extrémité  
10 libre de l'acide nucléique, ce qui induit au moins une étape supplémentaire. Ce marquage n'est pas associé à une fragmentation.

De plus, en ce qui concerne les deux documents précédents, le marquage est réalisé sur des acides nucléiques de grandes tailles. En effet, aucune phase de fragmentation, également appelée phase de clivage, n'a été décrite avant les étapes de  
15 marquage. Ainsi, lorsque l'on hybride ces acides nucléiques cibles sur des sondes de capture, les duplex formés après hybridation ne sont pas stables. C'est également le cas lorsque les polynucléotides sont utilisés en tant que sondes de détection. Les raisons peuvent être dues à la gêne stérique ou au manque de spécificité entre le polynucléotide, qui a été synthétisé, et sa cible qui n'est pas forcément de même taille. Il va donc y avoir  
20 une perte quantitative et qualitative du signal.

La gêne stérique peut être le fait, non seulement, de la longueur de l'acide nucléique, mais également de l'existence ou de la conservation de structures secondaires. La fragmentation permet de détruire ces structures et ainsi d'optimiser l'hybridation. Cette gêne stérique joue un rôle particulièrement important dans le cas de  
25 l'hybridation sur des surfaces contenant des sondes de capture à forte densité, par exemple les puces à ADN mises au point par la société Affymetrix ("Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays", M. Shee et al., Science, 274, 610-614. "Light-generated oligonucleotide arrays for rapide DNA sequence analysis", A. Caviani Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026). Dans cette technologie,  
30 les sondes de capture sont généralement de tailles réduites, autour de vingt nucléotides.

En ce qui concerne la fragmentation des acides nucléiques, de nombreuses méthodes sont décrites dans l'état de la technique.

Premièrement, la fragmentation peut être enzymatique, c'est-à-dire que la fragmentation des acides nucléiques peut être réalisée par des nucléases (DNases ou RNases). On génère alors des fragments de petites tailles avec des extrémités 3'-OH, 5'-OH, 3'-phosphate, 5'-phosphate.

Deuxièmement, la fragmentation peut être chimique. Par exemple dans le cas des ADN, on peut effectuer la dépurination ou la dépyrimidination des ADN, qui sont alors fragmentés en présence d'une base par un mécanisme dit de «  $\beta$ -élimination ». La fragmentation des ADN peut être réalisée par des mécanismes d'oxydation, d'alkylation, d'addition de radicaux libres entre autres. Pour fragmenter les ARN, on utilise des cations métalliques souvent associés à des molécules organiques utilisées comme catalyseurs chimiques, par exemple l'imidazole. Cette fragmentation est préférentiellement réalisée en milieu alcalin et génère des fragments avec des extrémités 3'-phosphate.

Cependant, ces fragmentations n'ont pas pour objet de faciliter ou de permettre le marquage.

Le document WO-A-88/04300 propose une méthode qui permet la fragmentation et le marquage d'ARN, la fragmentation s'effectuant par l'intermédiaire d'ARN ayant des propriétés enzymatiques, les ribozymes. Cette fragmentation par les ribozymes libère pour chaque coupure une extrémité (5') HO-acide nucléique et une extrémité (3') HO-PO<sub>2</sub>-acide nucléique. Le marquage, qui est uniquement radioactif, s'effectue ensuite par l'intermédiaire d'une enzyme d'incorporation (kinase) qui permet l'incorporation d'un phosphate radioactif rapporté, provenant d'une molécule de  $\gamma$ -GTP. Cette fixation s'effectue uniquement au niveau de l'extrémité 5'. De plus, la fragmentation est réalisée uniquement par des ribozymes, ce qui implique qu'il y ait une spécificité entre ceux-ci et les acides nucléiques cibles à couper. Le phosphate fait alors office de marqueur.

Notre invention permet une fixation d'un marqueur au niveau du seul phosphate, d'un fragment d'acide nucléique, libéré lors de la coupure. Il n'y a aucune spécificité, la fragmentation pouvant être réalisée sur n'importe quel type d'acide nucléique et ce de

manière aléatoire. En fait, notre procédé permet par exemple la préparation de sonde de détection. Enfin, le phosphate n'est qu'un bras de liaison entre l'acide nucléique et le marqueur.

5       Aucun procédé de fragmentation avant marquage en une ou deux étapes n'a été décrit dans l'art antérieur.

La présente invention propose donc un procédé qui pallie les inconvénients précédemment cités. En effet, il permet d'obtenir un marquage uniforme des fragments d'ARN, dès la fragmentation terminée. De plus, la fragmentation permet d'obtenir des  
10 fragments d'une taille optimale pour une éventuelle hybridation. L'hybridation étant de meilleure qualité, la révélation de cette hybridation sera plus rapide et efficace.

Par marquage, on entend la fixation d'un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces marqueurs suit :

- 15       • les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants,
- les groupements à densité électronique détectable par microscopie électronique ou  
20 par leur propriété électrique comme la conductivité, l'ampérométrie, la voltamétrie, l'impédance,
- les groupements détectables, par exemple dont les molécules sont de tailles suffisantes pour induire des modifications détectables de leurs caractéristiques physiques et/ou chimiques, cette détection peut être réalisée par des méthodes  
25 optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation de surface, la variation d'angle de contact ou des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel,
- les molécules radioactives comme le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$  ou le  $^{125}\text{I}$ .

Des systèmes indirects peuvent être aussi utilisés, comme par exemple des  
30 ligands capables de réagir avec un anti-ligand. Les couples ligand/anti-ligand sont bien

connus de l'homme du métier, ce qui est le cas par exemple des couples suivants biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand qui porte l'agent de liaison. L'anti-ligand peut être détectable directement par les  
5 marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un ligand/anti-ligand.

Ces systèmes de détection indirects peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est bien connue de l'homme du métier, et l'on pourra se reporter aux demandes de brevet antérieures  
10 FR98/10084 ou WO-A-95/08000 de la demanderesse ou à l'article J. Histochem. Cytochem. 45 : 481-491, 1997.

A cet effet, la présente invention concerne un procédé de marquage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel, caractérisé en ce qu'il consiste :

- 15 - à fragmenter l'ARN, et  
- à marquer au niveau du phosphate terminal situé à l'extrémité 3' et/ou 5' de chaque fragment dudit ARN, ledit phosphate terminal ayant été libéré lors de la fragmentation.

Selon un mode préférentiel de fonctionnement, le marquage de l'extrémité 3' de chaque fragment de l'ARN s'effectue pour chaque fragment à l'exception du fragment  
20 constituant l'extrémité 3' et/ou 5' de l'ARN de départ, et/ou le marquage de l'extrémité 5' de chaque fragment de l'ARN s'effectue pour chaque fragment à l'exception du fragment constituant l'extrémité 5' de l'ARN de départ.

Selon un premier mode de réalisation, la fragmentation et le marquage s'effectue en une étape.

25 Selon un second mode de réalisation, la fragmentation et le marquage s'effectue en deux étapes.

Quel que soit le mode de réalisation, le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate en position 2', en position 3' ou en position 2'-3'-monophosphate cyclique, par rapport au ribose, d'une fonction  
30 réactive portée par un marqueur ou pouvant s'associer ultérieurement à au moins un



marqueur. Lorsqu'il y a au moins deux marqueurs, il s'agit d'une technique d'amplification du signal.

La fragmentation et/ou le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate en position 2', en position 3' ou en position 2'-3'-monophosphate cyclique, par rapport au ribose, d'une fonction  
5 nucléophile, électrophile, halogénure portée par un marqueur ou pouvant s'associer ultérieurement à un marqueur.

La fragmentation de l'ARN s'effectue par voie enzymatique, chimique ou physique.

10 La fragmentation par voie enzymatique de l'ARN est réalisée par des nucléases.

La fragmentation par voie chimique de l'ARN est réalisée par des cations métalliques associés ou non à un catalyseur chimique.

Dans ce cas, les cations métalliques sont des ions  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Co^{++}$  et/ou  $Zn^{++}$ , et le catalyseur chimique est constitué par de l'imidazole, un analogue substitué,  
15 par exemple le N-méthyl-imidazole, ou toute molécule chimique ayant une affinité pour l'ARN et portant un noyau imidazole ou un analogue substitué.

La fragmentation par voie physique de l'ARN est réalisée par sonication ou par radiation.

Dans tous les cas de figure, le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate relié à la position 2', à la position 3' ou  
20 à la position 2'-3'-monophosphate cyclique du ribose, d'une molécule R-X, où R est constitué par le marqueur et X est l'agent de liaison entre le marqueur et l'ARN, tel qu'un groupement hydroxyle, amine, hydrazine, alcoxylamine, halogénure d'alkyle, phényl-méthyle halogénure, iodoacétamide, maléimide.

25 La présente invention consiste également en un fragment d'ARN obtenu par le procédé, selon les caractéristiques ci-dessus exposées, qui est caractérisé par le fait que le fragment d'ARN comporte, d'une part, un seul nucléotide marqué au niveau du phosphate terminal situé à l'extrémité 3' ou 5' du fragment d'ARN, ledit phosphate terminal ayant été libéré lors de la fragmentation, et d'autre part, au moins un autre  
30 nucléotide dont la base (purique : adénine/guanine ou pyrimidique : uracyle/cytosine) est identique à celle du nucléotide marqué.

Ce fragment d'ARN comporte de 10 à 100 nucléotides, préférentiellement de 30 à 70 et préférentiellement de 40 à 60 nucléotides.

Selon un mode préférentiel de réalisation, le fragment d'ARN comporte au moins un nucléotide thiophosphate.

5 De plus, le nucléotide marqué est un nucléotide thiophosphate.

L'invention concerne l'utilisation d'un fragment d'ARN, tel que défini ci-dessus, comme sonde de détection d'un ARN et/ou d'un ADN ou d'un fragment d'ARN et/ou d'ADN.

10 L'invention concerne enfin l'utilisation d'un fragment d'ARN, tel que défini ci-dessus, comme cible marqué pouvant se fixer sur une sonde de capture.

Les figures ci-jointes montrent différents modes de synthèse de fragments d'ARN marqués selon l'invention, ainsi que les fragments ainsi obtenus. Ils représentent des modes particuliers de réalisation et ne peuvent pas être considérés comme limitant la portée de la présente invention.

15 La figure 1 représente une vue schématique de la fragmentation chimique d'un ARN, en présence de cations  $Mn^{++}$  et d'imidazole.

La figure 2 représente une vue schématique de la fragmentation et du marquage d'un ARN, par un marqueur portant une fonction nucléophile.

20 La figure 3 représente un marqueur utilisable avec le procédé exposé à la figure 2, ce marqueur étant constitué par de la fluorescéine-cadavérine.

La figure 4 représente un marqueur utilisable avec le procédé exposé à la figure 2, ce marqueur étant constitué par de la fluorescéine-hydrazide.

La figure 5 représente un marqueur halogéné utilisable avec le procédé selon l'invention.

25 La figure 6 représente une vue schématique de l'extrémité 3' d'un fragment d'ARN obtenu par un procédé selon la présente invention, où le marqueur est fixé sur un phosphate naturel, Z étant un bras de couplage, également appelé bras espaceur, tel que défini dans une précédente demande de brevet de la demanderesse déposée le 1<sup>er</sup> août 1997 sous le numéro PCT/FR97/01445. Cette définition de Z est également vraie  
30 pour les figures 7 et 8.

La figure 7 représente une vue schématique de l'extrémité 3' d'un fragment d'ARN obtenu par un procédé selon la présente invention, où le marqueur est fixé sur un thiophosphate.

Enfin, la figure 8 représente une vue schématique de l'extrémité 5' d'un fragment d'ARN obtenu par un procédé selon la présente invention, où le marqueur est fixé sur un phosphate naturel.

Le procédé décrit sur les figures peut être en une étape, comme c'est le cas sur la figure 2 où la fragmentation et le marquage sont réalisés conjointement par un nucléophile marqué.

Le procédé peut être réalisé également en deux étapes. Une première étape de fragmentation selon la figure 1, par action de l'imidazole par exemple. Enfin, une seconde étape de marquage par l'intermédiaire d'un marqueur, représenté de manière non limitative aux figures 3 à 5 ; un tel marquage s'effectue sur le phosphate libéré et est exposé aux figures 6 à 8.

### Exemple 1 - Préparation des ARN amplicons et ARN transcrits

#### A - Préparation des amplicons naturels :

Les amplicons naturels (ARN simple brin) sont préparés en utilisant la technique d'amplification TMA (Transcription-Mediated Amplification) développée par Gen Probe (San Diego, CA). Le brin d'ARN amplifié correspond à la séquence 16S des ribosomes de *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC -27294). L'ARN 16 S a été cloné dans un plasmide et transformé dans des bactéries issues du kit TA Cloning Dual Promoter (Réf. : K2050-01- Invitrogen, Groningen, Pays Bas). Après culture en milieu LB (décrit par exemple dans le Maniatis) et extraction de l'ADN bactérien par lyse alcaline, le brin a été transcrit par le kit "Ampli Scribe T7 Transcription" (Réf. : AS 2607 - Epicentre Technologies (Madison, WI)). Le nombre de copies par microlitre a été déterminé par mesure de l'absorbance à 260 nm.

30

### B - Préparation des ARN transcrits à partir d'ADN obtenu par TMA

Il convient tout d'abord de noter que le produit d'amplification TMA contient, en plus des ARN, des amplicons ADN, dans une proportion de sensiblement 90 % d'ARN pour 10 % d'ADN. Ce sont ces amplicons ADN qui ont été aussi utilisés pour  
5 produire des ARN simple brin par transcription *in vitro*.

On a tout d'abord dans une première étape obtenu des amplicons avec le kit Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) de Gen Probe (Réf : 1001E), de la même manière que précédemment selon le protocole décrit dans l'étape 1-A ci-dessus.

Dans une seconde étape, la transcription a été réalisée sur une matrice ADN  
10 obtenue par TMA de la première étape, à partir d'une matrice ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*.

La transcription a été réalisée à partir de 5 µl de produits TMA en utilisant le kit MEGAscript T7 (AMBION, Austin, TX, Ref : 1334). La réaction a eu lieu pendant une  
15 heure à 37°C.

### C - Préparation des ARN transcrits à partir d'ADN obtenus par PCR

A partir d'un isolat bactérien (ATCC-27294), cultivé sur milieu Lowenstein-Jensen, une ou deux colonies (3-5 mm de diamètre équivalent à 10<sup>8</sup> bactéries) ont été récoltées à l'aide d'une spatule et remis en suspension dans 250 µl d'eau stérile dans un  
20 tube Eppendorf de 1,5 ml. Les acides nucléiques ont été extraits du matériel cellulaire de la suspension bactérienne par une agitation vigoureuse au moyen d'un vortex en présence de billes de verre. Une telle extraction est bien décrite dans les demandes de brevet FR97/12164 du 23 septembre 1997 et FR98/09583 du 23 juillet 1998 déposées par la demanderesse.

25 Un aliquote de 5 µl du lysat a été ajouté directement à la réaction de PCR. Il est aussi possible d'ajouter 20 ng d'ADN plasmidique directement à la réaction de PCR.

La région 16S hypervariable a été amplifiée par PCR en utilisant des amorces spécifiques du genre *Mycobacterium* (positions 213-236 et 394-415 sur la séquence de référence de *M. tuberculosis*, M20940, Genbank), la taille de l'amplicon étant de 202  
30 paires de bases (pb). Les amorces contiennent aussi des séquences de promoteurs de bactériophage T3 ou T7, à leur extrémité 5'. Dans la représentation des amorces qui suit,

la séquence des promoteurs est en caractères minuscules et gras, alors que la séquence des mycobactéries est en majuscules.

T3 - M1 5'-aattaaccctcactaaagggAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCA

5 T7 - M2 5'-gtaatacgactcactatagggcTGTGGCCGGACACCCTCTCA

La PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 100 µl contenant 50 mM KCl, 10 mM de Tris, pH = 8,3, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,001% (m/v) de gélatine, 5 % (v/v) de DMSO, 0,5 µM de chaque amorce, 200 µM de chacun des quatre désoxynucléotides triphosphates, et 1,5 unités de polymérase Taq (AmpliTaq, Perkin-Elmer, Norwalk, CT). La réaction de PCR a été pratiquée dans un thermocycleur 2400 Perkin-Elmer (Norwalk, CT) avec une étape initiale de dénaturation à 94°C de 5 minutes (mn), et 35 cycles de 45 secondes (s) à 94°C, 30 s à 60°C, 30 s à 72°C, suivis de 10 mn à 72°C après le dernier cycle. Les produits de la réaction de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les amplicons contenant les promoteurs ont été utilisés pour produire des ARN simple brin par transcription *in vitro*. Chaque réaction d'un volume de 20 µl contient approximativement 50 ng de produits PCR, 20 unités de polymérase T3 ou T7 (Promega, Madison, WI), 40 mM de tampon Tris-Acétate, pH = 8,1, 100 mM d'acétate de Magnésium [Mg(AcO)<sub>2</sub>], 10 mM de DTT, 1,25 mM de chaque nucléotide triphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP). La réaction a eu lieu pendant une heure à 37°C.

#### D - Préparation des ARN transcrits contenant des thiophosphates à partir d'ADN obtenus par PCR :

Les amplicons obtenu par PCR, selon l'étape précédente I-C, contenant les promoteurs ont été utilisés pour produire des ARN simple brin contenant des thiophosphates par transcription *in vitro*. Chaque réaction d'un volume de 20 µl contient alors approximativement 50 ng de produits PCR, 20 unités de polymérase T3 ou T7 (Promega, Madison, WI), 40 mM de tampon Tris-Acétate, pH = 8,1, 100 mM d'acétate de Magnésium [Mg(AcO)<sub>2</sub>], 10 mM de DTT, 1,25 mM de chaque sorte de

nucléotides triphosphates ou thiophosphates (ATP- $\alpha$ -thiophosphate (ATP- $\alpha$ -S) ou CTP- $\alpha$ -thiophosphate (CTP- $\alpha$ -S)) selon deux solutions différentes :

- ATP- $\alpha$ -S, CTP, GTP et UTP, ou

- ATP, CTP- $\alpha$ -S, GTP et UTP

5 La réaction a eu lieu pendant une heure à 37°C

Le nucléotide thiophosphate utilisé était présent à 100% des 1,25 mM, venant donc en substitution du nucléotide naturel correspondant. Dans chaque cas, le produit de transcription a été analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6% en présence d'urée 7M. Après coloration au bromure d'éthidium, la taille du transcrit est

10 contrôlée et quantifiée par rapport à un standard déposé sur le gel

Les nucléotides ATP- $\alpha$ -S et CTP- $\alpha$ -S ont été obtenus de N&N Life Science Products (Boston, MA - USA).

### Exemple 2 - Fragmentation chimique des ARN :

15

La fragmentation chimique des ARN est souvent catalysée par des cations métalliques ( $Mn^{++}$ ,  $Mg^{++}$  ...) qui, en se liant au groupement phosphate, neutralisent la charge négative de l'oxygène et facilite ainsi l'attaque nucléophile sur le phosphate par l'hydroxyle en position 2' du ribose.

20 Cette attaque nucléophile peut être renforcée par la présence de molécules qui sont donneurs et accepteurs de protons, telles que le noyau imidazole (R. Breslow et R. Xu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1201-1207, 1993), comme cela est bien représenté dans la figure 1.

La fragmentation peut être réalisée à différentes températures et dans différentes

25 conditions. Selon le descriptif qui va suivre, deux types de fragmentations différentes ont été réalisées.

Il peut y avoir une fragmentation à 60°C. Dans ce cas, les transcrits ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*, ci-après appelée *Mycobactéries*, qui comportent 330 nucléotides (environ 66 pmoles), sont incubés dans une solution aqueuse d'imidazole

30 (30mM) et de chlorure de manganèse (30mM) à 60°C pendant 30 min. Le volume totale

de la solution de fragmentation est de 100 µl. L'ARN fragmenté est ensuite analysé sur gel de polyacrylamide (6X, urée 7M) et coloré au bromure d'éthidium.

Il peut également y avoir une fragmentation à 95°C. Alors, les transcrits ARN 16S de 330 nucléotides (66 pmoles) *Mycobactéries* sont incubés dans une solution aqueuse de chlorure de magnésium (30mM) à 95°C pendant 30 min. Le volume totale  
5 de la solution de fragmentation est de 100 µl. L'ARN fragmenté est ensuite analysé sur gel de polyacrylamide (6X, urée 7M) et coloré au bromure d'éthidium.

Dans les deux types de fragmentation, l'analyse sur gel montre la disparition du  
10 produit de départ et l'apparition de plusieurs fragments plus courts, dont la population la plus importante a une taille comprise entre 20 et 50 nucléotides.

Ce sont ces deux protocoles qui ont été utilisés pour introduire un marqueur fluorescent sur la chaîne d'ARN pendant sa fragmentation.

### 15        **Exemple 3 - Marquage pendant la fragmentation par introduction de marqueurs portant une fonction nucléophile :**

Une fonction plus nucléophile que l'hydroxyle, en position 2' du ribose, peut attaquer le phosphate neutralisé et permettre ainsi la fragmentation de la chaîne d'ARN en générant des fragments liés à cette fonction, via le groupement phosphate. Selon la  
20 figure 2, cette fonction peut être liée à un marqueur pour générer des fragments d'ARN marqués.

La fluorescéine-cadavérine, exposée en figure 3, portant une fonction amine et la fluorescéine-hydrazide, détaillée en figure 4, portant une fonction hydrazide ont été  
25 utilisées pour marquer un ARN 16S (330 nucléotides) de *Mycobactéries*, pendant la fragmentation à 65°C. De tels ARN ont été obtenus selon l'exemple 1B.

La fluorescéine cadavérine et la fluorescéine hydrazide ont été solubilisées dans de la DMF à une concentration finale de 7,5 mM. Elles proviennent de chez Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

30        A la cible d'ARN 16S (66 pmoles) en solution dans le tampon de fragmentation à 65°C (exemple 1), 1 µl de la solution de marqueur (7,5mM dans DMF) a été ajouté.

Après incubation à 65°C pendant 30 minutes, chaque produit de réaction a été hybridé, détecté et analysé sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA USA) selon le protocole fourni par le constructeur. Ces puces sont conçues pour l'identification de région particulière, et dans le cas présent de la région 213-415 de la séquence M20940 « Genbank » de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Dans le cas de la fluorescéine cadavérine ou de la fluorescéine hydrazide, la séquence a été retrouvée à 66%. Ceci indique que dans chaque cas le marqueur a été introduit pendant la fragmentation générant ainsi des fragments fluorescents et détectables. Une telle identification est bien décrite dans l'article d'A. Troesch et al, J. Clin Microbiol., 37(1), p. 49-55, 1999.

**Exemple 4 - Marquage pendant la fragmentation via un marqueur portant un halogénure de méthyle :**

Il est connu qu'un monophosphate peut être substitué par un marqueur portant un groupement phényl-méthyle halogénure (Voir T. Furuta et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 3139- 3142, 1993). La 5-bromo-fluorescéine, représentée à la figure 5, fait partie de cette catégorie de marqueurs halogénés.

Sachant que la réaction de fragmentation libère des extrémités 3'-monophosphate cyclique, en équilibre avec les formes ouvertes, l'étape de fragmentation peut servir pour attacher un marqueur sur les groupements phosphate en 3' des fragments ARN.

**A - Marquage des amplicons ARN obtenus par amplification TMA :**

Des amplicons ARN 16S (330 nucléotides) de *Mycobactéries* ont été préparés par amplification TMA, comme décrit dans l'exemple 1-A. La 5-bromo-fluorescéine a été obtenue chez Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Le chlorure de manganèse a été obtenu chez Sigma et l'imidazole chez Aldrich.

*A - 1. Marquage de 50 µl de TMA : protocole utilisant 6 mM d'imidazole et 60 mM du chlorure de manganèse :*



A 165 µl d'eau RNase free (Sigma), dans un tube en polypropylène de 5 ml, dont les dimensions sont de 12 mm de diamètre pour 75 mm de longueur, on ajoute 15 µl d'une solution d'imidazole (0,1 M), 15 µl d'une solution de chlorure de manganèse (1 M), 2,5 µl la 5-bromofluoresceïne (100 mM) dans le DMSO puis 50µl de produits TMA. Le mélange est homogénéisé par agitation au vortex et incubé à 60°C pendant 30 mn.

Après incubation, la solution a été utilisée sans aucune purification pour l'hybridation et la détection sur puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA USA), également appelée biopuce. Le protocole utilisé pour cette étape d'hybridation est celui fourni par le constructeur. Ces puces sont conçues pour l'identification de la région 213-415 de la séquence M20940 « Genbank » de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Les résultats sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous

Score obtenu	Intensité Médiane (Rfu)	Bruit de fond (Rfu)
91,2 %	1727	834

Tableau 1 : Résultats du marquage des fragments d'ARN marqués sans purification

Le pourcentage d'identification ou score obtenu correspond, dans l'identification par la technologie de la biopuce, à un pourcentage d'analyse par rapport à la séquence de référence. La séquence est identifiée à 91,2% et l'intensité médiane est de 1727 Rfu. Ceci indique que dans chaque cas le marqueur a été introduit pendant la fragmentation générant ainsi des fragments fluorescents et détectables. Il est aussi important de noter que le produit de réaction de marquage a été hybridé directement sur la puce sans aucune purification préalable. Ce résultat est très intéressant et montre que des ARN transcrits non purifiés peuvent être marqués de manière efficace par ce protocole de fragmentation utilisant l'imidazole et le chlorure de manganèse.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté le marquage de 50 µl puis 100 µl (volume total) d'une réaction TMA décrite dans l'exemple 1-A, en utilisant le protocole de marquage décrit ci-dessus et une étape de purification avant hybridation sur la puce à ADN.

Après incubation à 65°C, les deux produits de réaction de marquage contenant 50 µl et 100 µl de TMA ont été traités au butanol-1 pour extraire l'excès de la 5-bromofluoresceïne. Cette extraction a été réalisée avec deux fois 1ml de butanol-1 saturé en eau. Une telle extraction, comme celles qui suivront, est bien connue de l'état de la technique. Des informations complémentaires peuvent notamment être trouvées dans le document Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning (Second Edition, 1.46) Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Les résultats sont donnés dans le tableau 2 ci-dessous. Ces mesures sont effectuées après hybridation et lecture sur la biopuce.

Volume de TMA	Score obtenu	Intensité Médiane (Rfu)	Bruit de fond (Rfu)
50 µl	95,9 %	6867	169
100 µl	96,7%	5775	275

**Tableau 2** : Résultats du marquage des fragments d'ARN marqués avec purification

Le pourcentage d'identification ou score obtenu est voisin de 100% et les intensités obtenues sont très élevées. Ceci montre qu'une étape de purification avant hybridation peut améliorer les pourcentages d'identification, les intensités de marquage et réduire le bruit de fond. En effet, d'éventuels cycles de lavage post-hybridation supplémentaires ne sont plus nécessaires.

*A - 2. Marquage de 50 µl de TMA : protocole utilisant 30 mM d'imidazole et 30 mM du chlorure de manganèse*

A 112 µl d'eau RNase free (Sigma) dans un tube en polypropylène de 5 ml, on ajoute 75 µl d'une solution d'imidazole (0,1 M), 7,5 µl d'une solution de chlorure de

manganèse (1 M), 2,5 µl la 5-bromofluorescéine (100 mM) dans le DMSO puis 50 µl de produits TMA. Le mélange est homogénéisé par agitation au vortex et incubé à 60°C pendant 30 mn.

Après incubation, les deux produits de réaction de marquage sur 50 µl de produits TMA ont été traités au butanol-1 pour extraire l'excès de la 5-bromofluorescéine. Ces mesures sont effectuées après hybridation et lecture sur la biopuce. Cette extraction a été réalisée avec deux fois 1 ml de butanol-1 saturé en eau. Les résultats sont donnés dans le tableau 3 ci-dessous.

Volume de TMA	Score obtenu	Intensité Médiane (Rfu)	Bruit de fond (Rfu)
50 µl	92,7 %	444	131

10

Tableau 3 : Résultats du marquage des fragments d'ARN marqués avec purification

La séquence amplifiée est identifiée à 92,7% et l'intensité médiane est de 444 Rfu. Ces résultats montrent que le protocole utilisant 30 mM d'imidazole et 30 mM de MnCl<sub>2</sub> produit des fragments d'amplicon marqués. Cependant le niveau d'intensité est inférieur à celui obtenu avec le protocole imidazole/MnCl<sub>2</sub> = 6 mM/60 mM.

Cette stratégie peut être optimisée. La concentration élevée en sel métallique est certainement très importante pour la réaction de marquage. D'autres métaux ou d'autres tampons peuvent être utilisés pour réaliser cette réaction de marquage pendant la fragmentation.

20

#### B - Marquage des ARN transcrits obtenus par transcription post-amplification TMA :

Des cibles ARN transcrits 16S (330 nucléotides) de mycobactéries ont été préparées par transcription, comme décrit dans l'exemple 1-B.

25

A 165 µl d'eau RNase free (Sigma) dans un tube en polypropylène de 5 ml, on ajoute 15 µl d'une solution d'imidazole (0,1 M), 15 µl d'une solution de chlorure de manganèse (1 M), 2,5 µl la 5-bromofluorescéine (100 mM) dans le DMSO puis 50 µl de

produit de transcription. Le mélange est homogénéisé par agitation au vortex et incubé à 60°C pendant 30 mn.

Après incubation, la solution a été traitée comme décrit dans l'exemple 3 (A - 1.) pour éliminer l'excès de la 5-bromofluoresceïne. L'hybridation et la détection ont été réalisées ensuite sur la puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA USA), conçues pour l'identification de la région 213-415 de la séquence M20940 « Genbank » de l'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Les résultats sont donnés dans le tableau 4 ci-dessous.

Score obtenu	Intensité Médiane (Rfu)	Bruit de fond (Rfu)
97,6 %	1426	147

10      Tableau 4 : Résultats du marquage des ARN obtenus par transcription post-amplification TMA

La séquence est identifiée à 97,6% et l'intensité médiane est de 1426 Rfu. Ce résultat montre que la stratégie de marquage pendant la fragmentation utilisée pour marquer des ARN produits par transcription post-TMA est efficace. Ces cibles ARN transcrits sont utilisées dans la réaction de marquage sans aucune purification.

C - Marquage des ARN transcrits contenant des thiophosphates post-amplification PCR :

20      Des cibles ARN 16S (330 nucléotides) de mycobactéries ont été produites par des réactions de transcription post-PCR où 100% de l'adénine tri-phosphate (ATP) a été remplacée par l'ATP- $\alpha$ -thio (deux manipulations ont été réalisées) ou bien 100% de la cytidine tri-phosphate (CTP) a été remplacée par la CTP- $\alpha$ -thio (une manipulation a été réalisée), comme indiqué dans l'exemple 1-D.

25      Ces ARN ont été marqués en utilisant le protocole décrit ci-dessus en présence de l'imidazole et du chlorure de manganèse. Après incubation à 65°C pendant 30 mn, le produit de réaction a été hybridé, détecté et analysé sur puce à ADN (Affymetrix, Santa

Clara, CA USA) selon le protocole fourni par le constructeur. Les résultats sont donnés dans le tableau 5 ci-dessous.

Transcrits	Score obtenu	Intensité Médiane (Rfu)
ATP- $\alpha$ -S	97,1%	1186
	100%	1290
CTP- $\alpha$ -S	93,6%	1027

5     **Tableau 5** : Résultats du marquage des ARN contenant des thiophosphates obtenus par transcription post-amplification PCR

Les séquences sont identifiées à 97,1 et 100% dans le cas de l' ATP- $\alpha$ -S et à  
 10     93,6% dans le cas de la CTP- $\alpha$ -S. Les intensités médianes sont comprises entre 1000 et 1300 Rfu. Ce résultat montre que la stratégie de marquage pendant la fragmentation utilisée pour marquer des ARN, contenant des thio-phosphates, est efficace, et même aussi efficace que nucléotides ne contenant pas de soufre. Ces cibles ARN transcrits sont utilisée dans la réaction de marquage sans aucune purification.

#### 15     **Exemple 5 - Marquage d'ARN naturel :**

Une suspension bactérienne est obtenue à partir d'une souche pure isolée sur milieu solide. Cette suspension réalisée en eau stérile est standardisée à un indice de 2 MacFarland (soit environ  $3 \cdot 10^8$  bactéries/ml) puis est centrifugée en tube Eppendorf  
 20     pendant 1 min.

L'ARN est extrait de la biomasse bactérienne de la façon suivante. Le culot bactérien est lysé par resuspension dans 100  $\mu$ l de tampon de lyse (Tris.HCl 30 mM, EDTA 5mM, NaCl 100 mM SDS 2%, protéinase K 5 mg /ml, pH 7,3 en présence de 50  $\mu$ l de billes de verre rondes de 100  $\mu$ m de diamètre, fabrication VIA1 France). On  
 25     vortexe pendant 30 sec. Puis on incube pendant 15 mn à 37°C. On ajoute alors 100  $\mu$ l de phénol saturé. On soumet à un vortex pendant 30 s. La phase aqueuse est récupérée

puis extraite avec 100 µl de chloroforme. On soumet à nouveau à un vortex pendant 30 s. La phase aqueuse est de nouveau récupérée. Deux extractions éther sont conduites puis ce solvant est évaporé. Il reste alors environ 50 µl de phase aqueuse contenant les ARN totaux. De manière alternative pour cette extraction on peut utiliser le kit Qiagen RNeasy.

Le marquage des ARN totaux de la biomasse bactérienne par la technique décrite dans la présente invention est réalisée de la façon suivante par ajout des réactifs dans l'ordre suivant :

- 10       - totalité des ARN extraits (50 µl),
- eau (qsp 100 µl),
- 6 µl imidazole 1 M (60 mM final),
- 6 µl MnCl<sub>2</sub> 1 M (60 mM final),
- on soumet la solution à un vortex pendant 10 s,
- 15       - 2 µl de 5-Bromo-fluorescéine 50 mM (1 mM final),
- on homogénéise en prélevant plusieurs fois à l'aide d'une pipette,
- on soumet à nouveau à un vortex pendant 1 s,
- on centrifuge 1 s pour collecter en bas du tube, et
- on incube 30 mn à 60 °C.

20

Pour éliminer le marqueur libre en excès, on procède ensuite de la façon suivante. A partir des 100 µl marqués on ajoute :

- 40 µl d'ADN de sperme de saumon
- 100 µl d'acétate de sodium 3 M (610 mM) final) pH 5,2
- 25       - 250 µl d'isopropanol froid (-20°C)

On soumet à un vortex, puis on centrifuge 1 mn. On élimine le surnageant. Le culot est alors remis en suspension dans le tampon d'hybridation (6 x SSPE, 5mM DTAB, betaine 3 M, Triton 0.05 %, 250 µg/ml d'ADN de sperme de hareng)

30

On visualise sur un gel d'agarose 1% avec le bromure d'éthidium

- un aliquote de la préparation d'ARN totaux avant marquage selon l'invention (A),
- un aliquote de la préparation d'ARN totaux après marquage selon l'invention (B).

Après visualisation du bromure d'éthidium sous ultraviolets (UV), on note

- pour le puits A la présence des bandes caractéristiques d'ARN majoritaires, avec de haut en bas: 23S, 16S puis une bande diffuse correspondant à la population d'ARN messager,
- pour le puits B la présence en bas du gel d'une population correspondant au mélange total d'ARN fragmenté.

Après visualisation de la fluorescéine, on note :

- pour le puits A : rien du tout,
- pour le puits B la présence en bas du gel d'une population correspondant au mélange d'ARN fragmenté et marqué de manière covalente à la fluorescéine ce qui montre que les ARN ont été fragmentés et marqués. Ce contrôle a été effectué pour toutes les espèces bactériennes décrites dans le tableau ci-dessous.

Un aliquote des ARN ainsi marqués est hybridé sur un support solide en verre (biopuce) où sont greffés par photolithographie des oligonucléotides permettant l'identification de ces différentes espèces selon un procédé équivalent à celui décrit dans l'article d'A. Troesch et al, J. Clin Microbiol., 37(1), p. 49-55, 1999. Les résultats sont reproduits sur le tableau 6 suivant.

Espèces	Référence souchier international	Référence souchier interne	Score obtenu
<i>Escherichia coli</i>	ATCC11775T	7308009	86,3%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NCTC7465T	7804060	87,2%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC13883T	7308012	84,6%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC10145	7309001	79,1%
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC13047T	7308013	81%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC13813	7701031	89,1%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC13182T	9211047	85,5%
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC29935T	9410068	81,5%
<i>Salmonella typhimurium</i>	---	9810059	71,3%

**Tableau 6** : Résultats du marquage des ARN naturels de différentes espèces

L'espèce ayant le score le plus élevé sur la biopuce est toujours l'espèce  
 5 recherché, le score obtenu est indiqué sur la colonne de droite.

Pour toutes les espèces, l'identification est correcte, montrant que le procédé de  
 la présente invention est efficace aussi bien sur ARN naturels que sur des ARN issus  
 d'une technique d'amplification.



## REVENDICATIONS

1. Procédé de marquage d'un acide ribonucléique (ARN) de synthèse ou naturel, caractérisé en ce qu'il consiste

- 5       - à fragmenter l'ARN, et  
      - à marquer au niveau du phosphate terminal situé à l'extrémité 3' et /ou 5' de chaque fragment dudit ARN, ledit phosphate terminal ayant été libéré lors de la fragmentation.

2. Procédé, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le marquage de  
10 l'extrémité 3' de chaque fragment de l'ARN s'effectue pour chaque fragment à l'exception du fragment constituant l'extrémité 3' de l'ARN de départ, et/ou que le marquage de l'extrémité 5' de chaque fragment de l'ARN s'effectue pour chaque fragment à l'exception du fragment constituant l'extrémité 5' de l'ARN de départ.

15       3. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la fragmentation et le marquage s'effectue en une étape.

4. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la fragmentation et le marquage s'effectue en deux étapes.

20

5. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate en position 2', en position 3' ou en position 2'-3'-monophosphate cyclique, par rapport au ribose, d'une fonction réactive portée par un marqueur ou  
25 pouvant s'associer ultérieurement à un marqueur.

6. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la fragmentation et/ou le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate en position 2', en position 3' ou en position 2'-  
30 3'-monophosphate cyclique, par rapport au ribose, d'une fonction nucléophile,

électrophile, halogénure portée par un marqueur ou pouvant s'associer ultérieurement à au moins un marqueur.

7. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce  
5 que la fragmentation de l'ARN s'effectue par voie enzymatique, chimique ou physique.

8. Procédé, selon la revendication 7, caractérisé en ce que la fragmentation par voie enzymatique de l'ARN est réalisée par des nucléases

10 9. Procédé, selon la revendication 7, caractérisé en ce que la fragmentation par voie chimique de l'ARN est réalisée par des cations métalliques associés ou non à un catalyseur chimique.

15 10. Procédé, selon la revendication 9, caractérisé en ce que les cations métalliques sont des ions  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Co^{++}$  et/ou  $Zn^{++}$ , et que le catalyseur chimique est constitué par de l'imidazole, un analogue substitué, par exemple le N-méthyl-imidazole, ou toute molécule chimique ayant une affinité pour l'ARN et portant un noyau imidazole ou un analogue substitué.

20 11. Procédé, selon la revendication 7, caractérisé en ce que la fragmentation par voie physique de l'ARN est réalisée par sonication ou par radiation.

25 12. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le marquage de l'extrémité 3' ou 5' d'un fragment d'ARN s'effectue par fixation, sur le phosphate relié à la position 2', à la position 3' ou à la position 2'-3'-monophosphate cyclique du ribose, d'une molécule R-X, où R est constitué par le marqueur et X est l'agent de liaison entre le marqueur et l'ARN, tel qu'un groupement hydroxyle, amine, hydrazine, alcoxylamine, halogénure d'alkyle, phényl-méthyle halogénure, iodoacétamide, maléimide.

13. Fragment d'ARN obtenu par le procédé, selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé par le fait que le fragment d'ARN comporte, d'une part, un seul nucléotide marqué au niveau du phosphate terminal situé à l'extrémité 3' ou 5' du fragment d'ARN, ledit phosphate terminal ayant été libéré lors de la fragmentation, et d'autre part, au moins un autre nucléotide dont la base (purique : adénine/guanine ou pyrimidique : uracyle/cytosine) est identique à celle du nucléotide marqué.

14. Fragment d'ARN, selon la revendication 13, caractérisé par le fait qu'il comporte de 10 à 100 nucléotides, préférentiellement de 30 à 70 et préférentiellement de 40 à 60 nucléotides.

15. Fragment d'ARN, selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisé par le fait que le fragment d'ARN comporte au moins un nucléotide thiophosphate.

16. Fragment d'ARN, selon la revendication 15, caractérisé par le fait que le nucléotide marqué est un nucléotide thiophosphate.

17. Utilisation d'un fragment d'ARN, selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, comme sonde de détection d'un ARN et/ou d'un ADN ou d'un fragment d'ARN et/ou d'ADN.

18. Utilisation d'un fragment d'ARN, selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, comme cible marqué pouvant se fixer sur une sonde de capture.

1 / 3

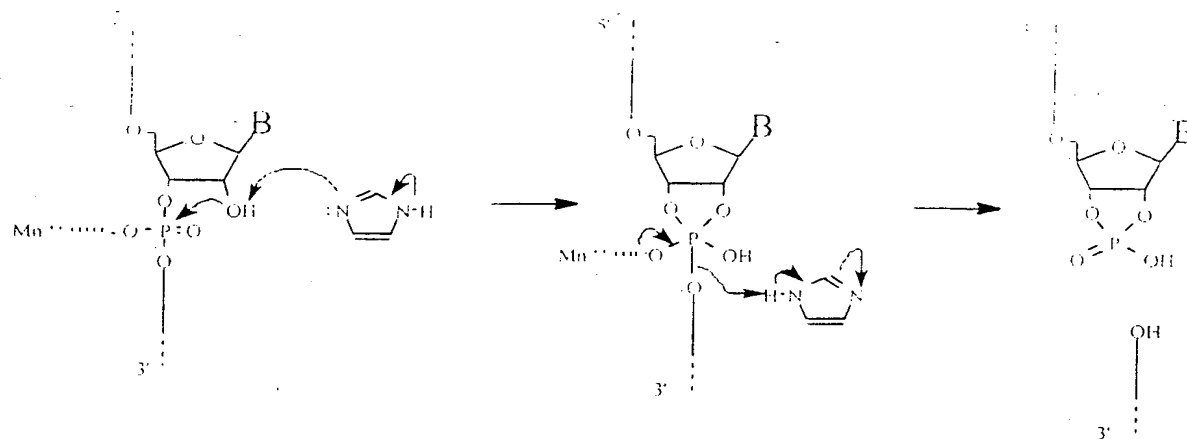


Fig. 1

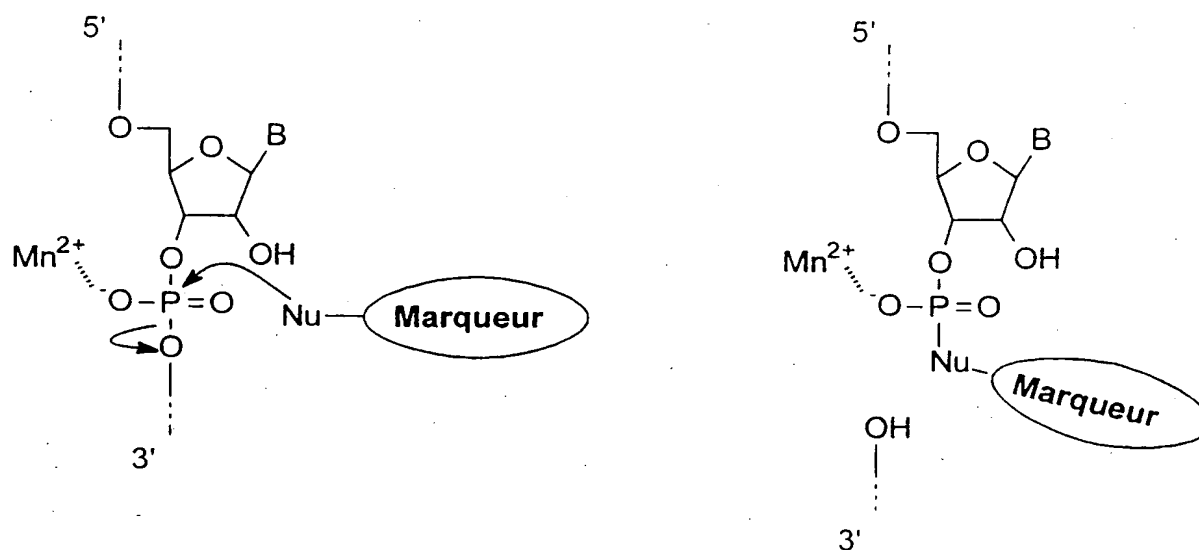


Fig. 2

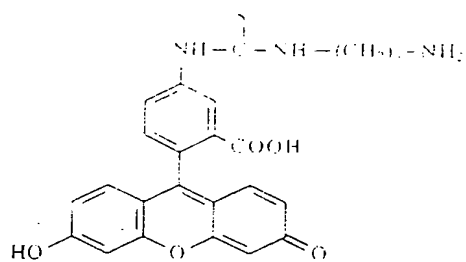
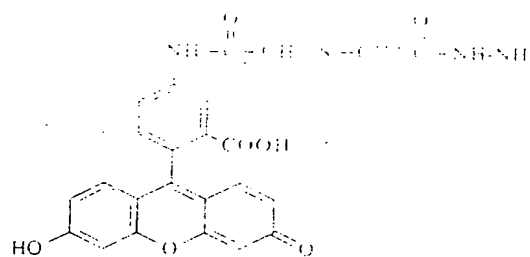
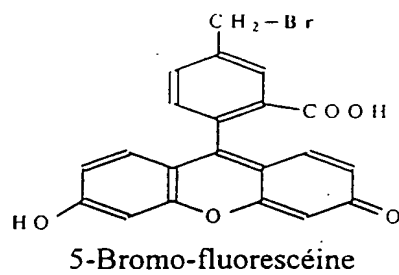
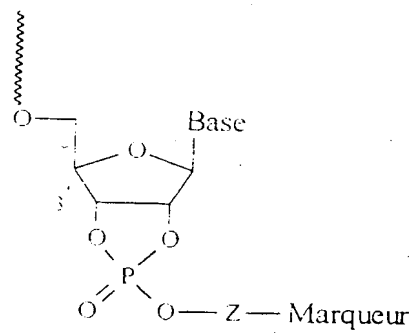
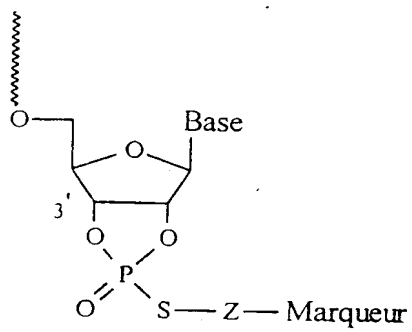
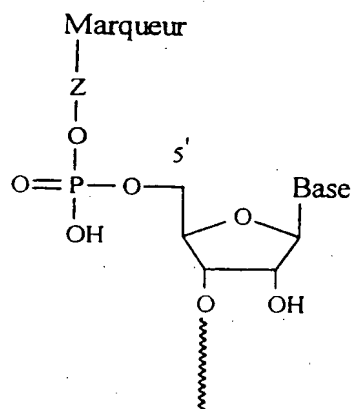
2 / 3Fig. 3Fig. 4

Fig. 5

3 / 3

Fig. 6Fig. 7Fig. 8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No

PCT/FR 99/01469

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07H21/00 C12Q1/68 C12N15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07H C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 88 04300 A (UNIVERSITY PATENTS INC) 16 June 1988 (1988-06-16)  claims 67,68 ---	1,2,4,5, 7,8,13, 14,17,18
A	WO 93 16094 A (CHROMAGEN INC) 19 August 1993 (1993-08-19) claims 1,2,5-8 ---	1,17,18
X	US 5 684 149 A (MORROW JANET R) 4 November 1997 (1997-11-04) column 6, line 21-33; figure 5 ---	13-16
A	DE 39 10 151 A (LINDL TONI DR ;SELIGER HARTMUT PROF DR (DE); ORTIGAO FLAVIO RAMALH) 4 October 1990 (1990-10-04) claims 1,2 ---	1,9,10, 17
X		13,14
A		1,17,18
X		13,14
	--- -/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 August 1999

Date of mailing of the international search report

23/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01469

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 567 841 A (MERCK PATENT GMBH) 3 November 1993 (1993-11-03)	1, 17, 18
X	the whole document	13, 14
X	US 5 317 098 A (MILLAR SHARON L ET AL) 31 May 1994 (1994-05-31) claims 1-18	13, 14
A	WO 98 11104 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19 March 1998 (1998-03-19) claims 1-16	1, 13, 17, 18
A	WO 96 28460 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;MUEHLEGGGER KLAUS (DE); ELTZ HERBERT VON) 19 September 1996 (1996-09-19) claims 1-12	1, 13, 17, 18
A	GREISEN ET AL: "PCR probes and primers for the 16S rRNA of most species of pathogenic bacteria found in Cerebrospinal fluid" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 2, February 1994 (1994-02), pages 335-351, XP002080618 abstract	1, 13, 17, 18
A	WO 95 03142 A (BIO MERIEUX) 2 February 1995 (1995-02-02) claims 1, 5-23	1, 13, 17, 18
A	WO 98 05766 A (GUILLOU BONNICI FRANCOISE ;BIO MERIEUX (FR); HOANG ANTOINE (FR); L) 12 February 1998 (1998-02-12) the whole document	1, 13, 17, 18



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/FR 99/01469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8804300 A	16-06-1988	US 4987071 A AT 129251 T DE 3751567 D DE 3751567 T EP 0291533 A HK 188395 A JP 2530906 B JP 1501445 T MX 9203713 A US 5591610 A US 5037746 A US 5116742 A US 5093246 A US 5354855 A	22-01-1991 15-11-1995 23-11-1995 02-05-1996 23-11-1988 22-12-1995 04-09-1996 25-05-1989 01-07-1992 07-01-1997 06-08-1991 26-05-1992 03-03-1992 11-10-1994
WO 9316094 A	19-08-1993	CA 2129105 A EP 0628051 A JP 7504087 T US 5763167 A US 5652099 A US 5728525 A	19-08-1993 14-12-1994 11-05-1995 09-06-1998 29-07-1997 17-03-1998
US 5684149 A	04-11-1997	NONE	
DE 3910151 A	04-10-1990	NONE	
EP 0567841 A	03-11-1993	DE 4213703 A JP 6065280 A	28-10-1993 08-03-1994
US 5317098 A	31-05-1994	NONE	
WO 9811104 A	19-03-1998	DE 19637042 A EP 0927180 A	19-03-1998 07-07-1999
WO 9628460 A	19-09-1996	DE 19509038 A CA 2215176 A EP 0815117 A JP 11503306 T	19-09-1996 19-09-1996 07-01-1998 26-03-1999
WO 9503142 A	02-02-1995	DE 4324433 C AU 7459394 A	25-08-1994 20-02-1995
WO 9805766 A	12-02-1998	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche internationale No

PCT/FR 99/01469

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07H21/00 C12Q1/68 C12N15/11

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07H C12Q C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 88 04300 A (UNIVERSITY PATENTS INC) 16 juin 1988 (1988-06-16)  revendications 67,68 ---	1,2,4,5, 7,8,13, 14,17,18
A	WO 93 16094 A (CHROMAGEN INC) 19 août 1993 (1993-08-19)  revendications 1,2,5-8 ---	1,17,18  13-16
X	US 5 684 149 A (MORROW JANET R) 4 novembre 1997 (1997-11-04)  colonne 6, ligne 21-33; figure 5 ---	1,9,10, 17 13,14
A	DE 39 10 151 A (LINDL TONI DR ;SELIGER HARTMUT PROF DR (DE); ORTIGAO FLAVIO RAMALH) 4 octobre 1990 (1990-10-04)  revendications 1,2 ---	1,17,18  13,14
X	---	---

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 août 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/08/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Scott, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 99/01469

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 567 841 A (MERCK PATENT GMBH) 3 novembre 1993 (1993-11-03)	1, 17, 18
X	le document en entier ---	13, 14
X	US 5 317 098 A (MILLAR SHARON L ET AL) 31 mai 1994 (1994-05-31) revendications 1-18 ---	13, 14
A	WO 98 11104 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 19 mars 1998 (1998-03-19) revendications 1-16 ---	1, 13, 17, 18
A	WO 96 28460 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ; MUEHLEGGGER KLAUS (DE); ELTZ HERBERT VON) 19 septembre 1996 (1996-09-19) revendications 1-12 ---	1, 13, 17, 18
A	GREISEN ET AL: "PCR probes and primers for the 16S rRNA of most species of pathogenic bacteria found in Cerebrospinal fluid" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 2, février 1994 (1994-02), pages 335-351, XP002080618 abrégé ---	1, 13, 17, 18
A	WO 95 03142 A (BIO MERIEUX) 2 février 1995 (1995-02-02) revendications 1, 5-23 ---	1, 13, 17, 18
A	WO 98 05766 A (GUILLOU BONNICI FRANCOISE ; BIO MERIEUX (FR); HOANG ANTOINE (FR); L) 12 février 1998 (1998-02-12) le document en entier -----	1, 13, 17, 18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche internationale No

PCT/FR 99/01469

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8804300 A	16-06-1988	US 4987071 A AT 129251 T DE 3751567 D DE 3751567 T EP 0291533 A HK 188395 A JP 2530906 B JP 1501445 T MX 9203713 A US 5591611 A US 5037711 A US 5116741 A US 5093246 A US 5354855 A	22-01-1991 15-11-1995 23-11-1995 02-05-1996 23-11-1988 22-12-1995 04-09-1996 25-05-1989 01-07-1992 07-01-1997 06-08-1991 26-05-1992 03-03-1992 11-10-1994
WO 9316094 A	19-08-1993	CA 2129105 A EP 0628051 A JP 7504087 T US 5763167 A US 5652099 A US 5728525 A	19-08-1993 14-12-1994 11-05-1995 09-06-1998 29-07-1997 17-03-1998
US 5684149 A	04-11-1997	AUCUN	
DE 3910151 A	04-10-1990	AUCUN	
EP 0567841 A	03-11-1993	DE 4213703 A JP 6065280 A	28-10-1993 08-03-1994
US 5317098 A	31-05-1994	AUCUN	
WO 9811104 A	19-03-1998	DE 19637042 A EP 0927180 A	19-03-1998 07-07-1999
WO 9628460 A	19-09-1996	DE 19509038 A CA 2215176 A EP 0815117 A JP 11503306 T	19-09-1996 19-09-1996 07-01-1998 26-03-1999
WO 9503142 A	02-02-1995	DE 4324433 C AU 7459394 A	25-08-1994 20-02-1995
WO 9805766 A	12-02-1998	AUCUN	